

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/40076 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61L 27/38**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03632

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. September 2001 (19.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 58 240.0 17. November 2000 (17.11.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **AUTOTISSUE GMBH** [DE/DE]; Hessische Strasse 3-4, 10115 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KONERTZ, Wolfgang** [DE/DE]; Max-Eyth-Strasse 32, 14195 Berlin (DE). **DOCHMEN, Pascal** [DE/DE]; Schamhorststrasse 28 B, 10115 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **WABLAT, Wolfgang**; Postdamer Chaussee 48, 14129 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PRODUCING BIOLOGICAL PROSTHESES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR HERSTELLUNG BIOLOGISCHER PROTHESEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for coating biological implants with autologous cells of the recipient, according to which the cell-free allogenic or xenogenic material foreign to the body is colonized in a speed-variable pulsating cell suspension flow close to the natural conditions in the respective organ or part of the organ. The resulting cell conditioning allows a complete, fast and safe coating with cells, the formation of which comes close to the natural conditions and guarantees a trouble-free functioning and a long life of the implant. The device for carrying out the method comprises a bioreactor (2) integrated into a loop (1) and filled with the cell suspension in which the implant (8) is axially and centrally fixated in the direction of flow. The loop (1) is connected to a pump (3) that generates a pulsating flow of medium that flows through the implant (8). The inventive coating with autologous cells can also be applied to artificial prostheses.

(57) Zusammenfassung: In einem Verfahren zur Beschichtung von biologischen Implantaten mit körpereigenen Zellen des Empfängers erfolgt die Besiedlung des zellfreien allogenen oder xenogenen Fremdmaterials in einem den natürlichen Verhältnissen in dem betreffenden Organ oder Organteil nahe kommenden geschwindigkeitsvariablen pulsierenden Zellsuspensionsstrom. Die dadurch bewirkte Zellkonditionierung gewährleistet eine vollständige, schnelle und sichere Zellbeschichtung, deren Ausbildung den natürlichen Verhältnissen nahe kommt und eine störungsfreie Funktion sowie eine lange Lebensdauer des Implantats sichert. Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens umfasst einen in eine Ringleitung (1) eingebundenen, mit der Zellsuspension gefüllten Bioreaktor (2), in dem das Implantat (8) in Strömungsrichtung axial und zentrisch fixiert ist. Die Ringleitung (1) ist an eine Pumpe (3) zur Erzeugung eines durch das Implantat (8) fliessenden, pulsierenden Medienstroms angeschlossen. Die erfindungsgemäße Beschichtung mit körpereigenen Zellen kann auch bei künstlichen Prothesen durchgeführt werden.

WO 02/40076 A1

Beschreibung

Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung biologischer

Prothesen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von biologischen Prothesen, insbesondere von Substituten für die Herz- und Gefäßchirurgie, bei dem aus allogenem oder 10 xenogenem Fremdmaterial durch Dezellularisierung eine Kollagen/Elastin-Matrix gewonnen, mit einem Kleber vorbehandelt und anschließend mit körpereigenen Zellen des Empfängers beschichtet wird, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Mit Bezug auf die Beschichtung mit körpereigenen Zellen ist das Verfahren gleichermaßen bei künstlichen Implantaten anwendbar.

Die Transplantation von Organen, Gefäßen und Haut wird chirurgisch im allgemeinen gut beherrscht. Probleme 20 bereitet jedoch die Bereitstellung geeigneter Transplantate, die möglichst gut einwachsen und lange haltbar sein sollen und im Körper des Empfängers möglichst noch mitwachsen und sich regenerieren können.

Ein wichtiger Bereich der Transplantationstechnik ist der Blutkreislauf und hier insbesondere das Herz mit seinem sensiblen, stark beanspruchten Klappensystem, dessen Funktion aus den unterschiedlichsten Gründen beeinträchtigt sein kann. Bei einem bestimmten Schweregrad der 25 Herzkappenerkrankung, das heißt, wenn eine medikamentöse Behandlung keinen Erfolg verspricht, ist ein Herzkappenersatz erforderlich. Besonders bewährt haben sich dabei unter den biologischen Herzkappen die sogenannten Homografts aus menschlichem Gewebe, die aber nur 30 beschränkt zur Verfügung stehen, und die gerüstfreien oder gerüsteten Bioprothesen porcinen Ursprungs oder aus 35

Rinderperikardium gefertigte Prothesen, die eine ähnlich günstige Hämodynamik wie die Homografts aufweisen und zudem in jeder Größe und Anzahl verfügbar sind.

5 Aufgrund der erforderlichen Konservierung enthalten diese Bioprothesen kein lebendes Gewebe und ein Zellwachstum ist praktisch nicht möglich. Auch solche Herzkappen sind daher nicht regenerationsfähig, nicht wachstumsfähig und zudem einem allmählichen Verschleiß unterworfen. Außerdem 10 werden diese Prothesen vom Immunsystem des Empfängerorganismus als „fremd“ eingestuft und durch immunkompetente Zellen bekämpft.

15 Zur Lösung dieses Problems wird in der DE 198 28 276 bereits ein Verfahren zur Herstellung bioartifizieller Transplantate beschrieben, bei dem eine zellfrei 20 gemachte, aufgelockerte Kollagen-Matrix mit autologen Zellen des Transplantat-Empfängers oder genetisch veränderten, für den Empfänger verträglichen Zellen besiedelt wurde. Bei diesem Verfahren bereitet jedoch die vollständige und für einen störungsfreien Blutstrom über die 25 Herzkappen und in den Blutgefäßen bzw. Umgehungsgefäßen notwendige, möglichst glatte, feste Beschichtung der Kollagen-Matrix mit körpereigenen Zellen des Empfängers Schwierigkeiten. Eine störungsfreie Funktion und eine lange Lebensdauer des Implantats ist daher nicht gewährleistet.

30 Zur Beseitigung dieser Nachteile wurde bereits ein Verfahren nebst zugehöriger Vorrichtung vorgeschlagen, bei dem sich eine azellularisierte Bioprothese in einem um seine Längsachse und/oder seine Querachse drehbaren Behälter befindet, der mit einer körpereigene oder genetisch identische Zellen des Empfängers aufnehmenden Nähr- 35 lösung gefüllt ist. Durch schrittweises Drehen mit Sedimentationspausen oder durch kontinuierliche Rotation und

die dabei auf die Zellen wirkenden Zentrifugalkräfte soll eine flächendeckende Beschichtung mit möglichst vielen lebenden Zellen gewährleistet werden.

5 Mit den bekannten Verfahren bzw. den entsprechenden Vorrichtungen ist es jedoch noch nicht möglich, eine gleichmäßige, ebenflächige und an die tatsächlichen Verhältnisse im menschlichen Körper weitgehend angepaßte vollständige Besiedlung der Kollagen-Matrix mit körpereigenen 10 Zellen zu bewirken.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der eingangs erwähnten Art zur Herstellung von biologischen, den natürlichen Verhältnissen hinsichtlich 15 der Zellbeschichtung nahekommen Prothesen, insbesondere von Herzkappen und Blutgefäßen, anzugeben, das die Haltbarkeit und die Funktionsfähigkeit des betreffenden Implantats verbessert und die Lebensqualität des Empfängers erhöht, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des 20 Verfahrens zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren gemäß den Merkmalen des Patentanspruches 1 und einer durch die Merkmale des Patentanspruches 8 gekennzeichneten Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gelöst.

Ausgehend von den bekannten Lösungen zur Herstellung von biologischen Prothesen, wonach ein azellularisiertes 30 allogenes oder xenogenes Ausgangsprodukt, beispielsweise die Kollagen/Elastin-Matrix einer Aortenklappe vom Schwein, durch Drehen in einer aus Zellen des Empfängers der Prothese gebildeten Zellsuspension mit körpereigenen Zellen besiedelt wird, besteht der Grundgedanke der 35 Erfindung darin, daß die Beschichtung der Matrix in einem an die natürlichen Strömungsbedingungen in den betreffenden Organen, Organteilen oder Gefäßen angenäherten Zell-

suspensionsstrom erfolgt. Durch eine solche dynamische Beschichtung lernen die aufzutragenden Zellen bereits in der Beschichtungs- und ersten Wachstumsphase, sich an die natürlichen Zustände während der späteren Funktion des

5 Organ(teils), z.B. Strömungsbedingungen und Wandbewegungen oder -dehnungen, bezüglich ihrer Anordnung, Form und Haftung anzupassen, so daß eine vollständige, allseitige und schnelle sowie sicher wachsende Besiedlung erreicht werden kann und die neue körpereigene Zellschicht in den

10 später blutdurchströmten Bereichen widerstands- und reibungsarme Strömungsbedingungen schafft. Tatsächlich ist das Verfahren durch drei Besiedlungsschritte gekennzeichnet:

15 1. Verteilen der Zellen auf dem in einem die Zellsuspension enthaltenden Bioreaktor zentrisch fixierten azellularen und mit Kleber behandelten Implantat durch Drehen des Bioreaktors mit anschließender Sedimentationsphase;

20 2. Überströmen der Implantatflächen mit einem den natürlichen Verhältnissen in dem betreffenden Organ- teil weitestgehend nachempfundenen Zellsuspensions- strom zur Konditionierung und weiteren Anlagerung der Zellen; und

25 3. Erholen und Wachsen der konditionierten Zellen in einer an die Überströmungsphase anschließenden Ruhe- phase.

30 Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung kann die Konditionierungs- und Ruhephase mit jeweils gegenüber der vorhergehenden Phase erhöhter Strömungsgeschwindigkeit in zwei oder mehreren Teilschritten durchgeführt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens umfaßt einen separat handhabbaren, in Längs- und Querrichtung von Hand oder motorisch drehbaren Bioreaktor, der mit der Zellsuspension gefüllt wird und in dem das zu beschichtende Implantat axial zur Durchströmungsrichtung straff fixiert wird. Für den Durchströmungs- oder Zellkonditionierungsvorgang ist der Bioreaktor in eine Ringleitung eingebunden, die zur Erzeugung eines pulsierenden, in der Geschwindigkeit veränderlichen Flussigkeitsstromes an eine Membranpumpe angeschlossen ist.

Aus den Unteransprüchen und der nachfolgenden Beschreibung eines Ausführungsbeispiels ergeben sich weitere Merkmale und vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung.

15 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und der entsprechenden Vorrichtung ist es möglich, mit körpereigenen Zellen beschichtete Implantate aus xenogenem oder allogenem oder künstlichem Fremdmaterial herzustellen, die über die bekannten Vorteile der Verwendung körpereigener Zellen hinaus auch in ihrer dynamischen Wirkung den natürlichen Verhältnissen weitestgehend entsprechen, eine lange Lebensdauer aufweisen sowie einen hohen Lebenskomfort gewährleisten.

20 25 Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird für die Herstellung einer gerüstfreien Aortenklappe anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

30 Fig. 1 eine schematische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Beschichtung einer azellularisierten porcinen Aortenklappe in einem Strömungskreislauf aus einer mit körpereigenen Endothelzellen des vorgesehenen Empfängers versetzten Nährlösung; und

Fig. 2 eine Schnittansicht eines in den Strömungskreislauf eingebundenen Bioreaktors, in dem die zu beschichtende Aortenklappe 5 fixiert ist.

Zunächst werden aus dem Körper des künftigen Empfängers der Bioprothese von einer Gefäßinnenhaut venöse oder arterielle, das heißt, besonders glatte Endothelzellen in 10 einem Durchströmungsverfahren mit Collagenase P 1.0 %ig gewonnen und mit üblichen Verfahren in einem Inkubator bei 37°C, 98 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Zuchtmittel aus DMEM, 20 % Serum, bFGF, Antibiotika, L-Glutamin und HEPES-Puffer gezüchtet, so 15 daß schließlich eine Zellsuspension mit mindestens 8 Millionen körpereigenen Zellen zur Verfügung steht.

Parallel zur Züchtung der Zellen wird eine geeignete Aortenklappe menschlichen oder tierischen Ursprungs, hier 20 eine Aortenklappe vom Schwein, von der überschüssiges Gewebe entfernt und die auf eine bestimmte Länge zugeschnitten wurde, in Desoxycholsäure azellularisiert und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung oder einer Phosphatpufferlösung solange behandelt, bis die 25 Desoxycholsäure restlos entfernt ist. Die so gewonnene Kollagen/Elastin-Matrix der ursprünglich eingesetzten porcinen Aortenklappe wird mit einem natürlichen Klebstoff, hier Pronectin + L-Laminin, bei 37°C behandelt, um bei der Besiedlung der Matrix mit körpereigenen Zellen 30 deren Adhäsion an der Matrixoberfläche zu erhöhen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Besiedlung mit körpereigenen Zellen ist in den Figuren 1 und 2 dargestellt und umfaßt eine Ringleitung 1, in die die zu behandelnde Aortenklappe 3 aufnehmender Bioreaktor 2, 35 eine Membranpumpe 3 und eine dem Bioreaktor 2 unmittelbar

nachgeschaltete Ausgleichskammer 4 eingebunden sind. Die Membranpumpe 3 ist in bekannter Weise als eine Blutpumpe ausgebildet, wie sie auch hilfsweise beim Menschen zur Erzeugung eines dem natürlichen Blutstrom nachempfun-

5 denen, mechanisch erzeugten Blutstroms eingesetzt wird.

Die Membranpumpe 3 ist über eine Schlauchleitung 5 an eine Antriebseinheit (nicht dargestellt) angeschlossen.

In die beiden Anschlüsse der Membranpumpe 3 an die Ringleitung 1 sind ein Auslaßventil 6 und ein Einlaß-

10 ventil 7, deren Funktion etwa der einer Herzklappe entspricht, integriert. Auf das Auslaßventil 6 kann

jedoch bei der Beschichtung von Herzklappen, wie unten erläutert, auch verzichtet werden.

15 Das Kernstück der Vorrichtung ist der Bioreaktor 2 zur Herstellung bzw. Behandlung einer Bioprothese, hier einer porcinen Aortenklappe 8. Der Bioreaktor 2 besteht aus einem transparenten Hohlzylinder 9 aus Piacryl mit an den offenen Stirnseiten zentrisch und abdichtend fixierten

20 Einsatzstücken 10 und 11 aus Teflon, die über Anschlußstutzen 12, 13 mit der Ringleitung 1 verbunden sind und jeweils einen in den Hohlzylinder 9 ragenden Befestigungsabschnitt 14, 15 mit radial am Umfang angeordneten Befestigungslöchern 16, 17 zum straffen Halten

25 der Aortenklappe 8 unter Spannung an deren stirnseitigen Rändern aufweisen. Der Außendurchmesser der beiden Befestigungsabschnitte 14, 15 der Einsatzstücke 10, 11 entspricht etwa dem Durchmesser der Aortenklappe 8. Das in Strömungsrichtung hintere Einsatzstück 11 ist über

30 einen Bundsteg 18 und eine erste Dichtung 27 an der Innenseite eines mit dem Hohlzylinder 9 verbundenen Ringsteges 20 verspannbar, und zwar mit Hilfe eines Schraubringes 21, dessen Innengewinde in ein Außengewinde am Einsatzstück 11 eingreift. Das Einsatzstück 10 weist einen Bund 22 auf, der an der Stirnfläche des Hohlzylin-
35 ders 9 zur Anlage kommt und mit dieser unter Verwendung

einer Schraubkappe 23 mit Innengewinde, das in ein Außen-
gewinde am Hohlzylinder 9 eingreift, verspannbar ist. Zur
flüssigkeitsdichten Befestigung ist eine zweite Dichtung
19 vorgesehen. Das dem Bioreaktor nachgeschaltete
5 Schlauchstück der Ringleitung 1 besteht aus flexiblem
Material (Silikon), so daß die Durchströmung aufgrund der
pulsierenden Pumpwirkung gewährleistet ist. Sämtliche
Teile der Vorrichtung, die mit dem Zellmaterial während
der Beschichtung in Berührung kommen, bestehen aus bio-
10 logisch abstoßendem Material, an dem die Zellen nicht haf-
ten können.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Ausbildung und Anordnung
der Einsatzstücke 10, 11 kann außerhalb des Hohlzylinders
15 9 eine entsprechend vorbereitete, das heißt, dezellulari-
sierte, mit dem natürlichen Kleber Pronectin + L-Laminin
behandelte und zugeschnittene Aortenklappe 8 an den
gegenüberliegenden Befestigungsabschnitten 14, 15 der
Einsatzstücke 10, 11 angenäht werden. In dieser Form wird
20 die Aortenklappe 8 in den Hohlzylinder 9 eingebracht, und
zwar so, daß die Strömungsrichtung in der Vorrichtung mit
der natürlichen Strömungsrichtung durch das Implantat im
menschlichen Körper übereinstimmt. Aufgrund dessen, daß
mit dem Auslaßventil 6 und der Aortenklappe 8 zwei quasi
25 gleichartige Ventile hintereinander geschaltet sind,
könnte in diesem Fall auf das Auslaßventil 6 der Membran-
pumpe 3 verzichtet werden. Wenn aber Blutgefäße in der
gleichen Weise mit Körperzellen beschichtet werden, ist
30 das Auslaßventil 6 in der Membranpumpe 3 weiterhin erfor-
derlich.

Für die Besiedelung der Aortenklappe liegen aus der oben
beschriebenen Zellzüchtung die als lebensfähig nachgewie-
senen Endothel-Zellen in einer Anzahl von mindestens 8
35 Millionen in dem auch bei der Zellzüchtung verwendeten
Medium vor, das zu 20 % aus Serum des Empfängers, den

handelsüblichen Zellwachstumsmitteln DMEM und bFGF sowie Antibiotika, L-Glutamin und gegebenenfalls einem HEPES-Puffer besteht. Diese Zellsuspension wird über einen der von der Ringleitung 1 gelösten Anschlußstutzen 12, 13 5 oder ein Füll- und Ablaßventil 24, 25 in den Bioreaktor 2 gefüllt. Nach dem Schließen des von der Ringleitung 1 gelösten Bioreaktors 2 an den Anschlußstutzen 12, 13 mit Stopfen oder Abdeckkappen (nicht dargestellt) wird als erster Besiedlungsschritt durch wiederholtes Drehen des 10 in einer Drehvorrichtung (nicht dargestellt) gehaltenen Bioreaktors 2 sowohl um seine Längsachse als auch um seine Querachse und dazwischenliegende Absetzphasen eine Verteilung der Endothelzellen auf den Flächen der Aortenklappe 8, und zwar sowohl unter der Wirkung der Schwerkraft als auch von Zentrifugalkräften, vorgenommen. Das 15 Drehen kann vorzugsweise auch manuell unter gleichzeitiger visueller Beobachtung durchgeführt werden. Bei an den Bioreaktor 2 angeschlossener Ringleitung 1 erfolgt anschließend ein erster Zellkonditionierungsschritt, 20 indem über die Membranpumpe 3 ein pulsierender Zellsuspensionsstrom mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 l/min in Richtung des Pfeils erzeugt wird. Die Strömungsrichtung der Zellsuspension entspricht der Strömungsrichtung des Blutes in implantiertem Zustand der Bioprothese. Bei 25 der impulsartigen Strömung der Zellsuspension über die Innenflächen (Strömungsflächen) der Aortenklappe 8 werden bei zunächst geringer Strömungsgeschwindigkeit allmählich die Endothelzellen durch den ständig wiederholten Strömungsreiz in ihrer Form und Ausrichtung an die Strömungsrichtung und -kräfte sowie die Bewegungen der Implantatwände angepaßt, d.h. die Zellen werden konditioniert und lernen, sich so auszubilden und anzuordnen, daß in der 30 Wachstumsphase eine glatte, der Strömung einen möglichst geringen Widerstand entgegengesetzende einschichtige Endothelzellenfläche entsteht. Das heißt, in der sich an den 35 ersten Zellkonditionierungsschritt anschließenden Ruhe-

phase, die mit einem diskontinuierlichen Drehen des Bioreaktors 2 verbunden sein kann, haben die Endothelzellen Gelegenheit, in der durch die zuvor eingegebene Strömungsreize erlernten Form und Richtung an der Kollagenmatrix zu wachsen. Beim Durchströmen gegebenenfalls abgelöste Zellen werden in dieser Phase wieder angesiedelt.

In dem darauffolgenden zweiten Zellkonditionierungsschritt mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 2 l/min werden die Endothelzellen mit entsprechend stärkeren Informationsreizen versorgt, um sich entsprechend diesen veränderten Strömungsbedingungen auszubilden und zu wachsen.

Nach einer weiteren Ruhe- und Wachstumsphase (Zwischeninkubation) ohne Strömungsbewegung der Zellsuspension, jedoch wahlweise bei einer Drehbewegung des Bioreaktors 2, folgt ein dritter Zellkonditionierungsschritt mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 l/min, an den sich wieder eine Nachinkubationsphase (Erholungs- und Wachstumsphase) anschließt.

Der gesamte zuvor beschriebene Vorgang der Zellbeschichtung in dem Bioreaktor 2 findet in einem Inkubator (nicht dargestellt) statt, in dem ständig eine Temperatur von 37°C herrscht und eine Luftfeuchtigkeit von 98 % sowie ein CO₂-Gehalt von 5 % aufrechterhalten werden. Der Zugang dieser Atmosphäre bzw. der entsprechenden Medien zum Bioreaktor 2 wird über mindestens ein semipermeables Membranventil 26 realisiert, das von außen gasdurchlässig ist, aber in umgekehrter Richtung nicht flüssigkeitsdurchlässig ist. Die Membranventile 26 können an einer geeigneten Stelle des Bioreaktors 2, z.B. in den Einsatzstücken 10, 11 oder auch in der Ringleitung 1 angeordnet sein.

Im Ergebnis dieses Prozesses der allmählichen Besiedlung und Ausbildung der Endothelzellen bei sich stufenweise erhöhender und dabei schonend und mit Lernfunktion auf die Zellen wirkender pulsierender Strömungsgeschwindigkeit mit zwischen- und nachgeschalteten Erholungs- und Wachstumsphasen wird unter physiologischen, den Funktionen des menschlichen Herzens entsprechenden Fließbedingungen auf der mit einer Submatrix aus Fibronectin versehenen Kollagen-Matrix der Bioprothese (Aortenklappe 8) eine geschlossene, einschichtige Endothelfläche aus körpereigenen Zellen gebildet, die der Endothelschicht an den Gefäß- und Klappenwänden des Prothesen-Empfängers hinsichtlich Form, Größe und Ansiedlung der Zellen sowie Stärke und Ebenflächigkeit der Zellschicht weitestgehend entspricht.

Es werden somit Implantate für die Herz- und Gefäßchirurgie bereitgestellt, deren Anwendung nicht mit der Gefahr von Immunreaktionen und viralen Infektionen verbunden ist. Von wesentlicher Bedeutung gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik ist hier die Tatsache, daß die auf das Implantat aufgebrachte Zellschicht weitestgehend annähernd den physiologischen Vorgängen im menschlichen Organismus, hier der spezifischen Dynamik im Bereich des Herzens und der Gefäße, ausgebildet ist. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und der entsprechenden Vorrichtung erreichte Ausbildung der Endothelzellenschicht gewährleistet im implantierten Zustand der Bioprothese mit den natürlichen Verhältnissen übereinstimmende Strömungsverhältnisse, so daß die Verschleißerscheinungen deutlich minimiert und damit die Lebensdauer des Implantats erhöht werden kann.

Die Erfindung ist nicht auf das zuvor beschriebene Ausführungsbeispiel beschränkt. Vielmehr sind im Schutzbereich der Patentansprüche vielfältige Modifikationen des

Verfahrens und der Vorrichtung denkbar. Anstelle der beispielhaft behandelten porcinen Aortenklappe können auch Pulmonal- oder Mitralklappen oder Gefäße, und zwar allgemein aus allogenem, xenogenem oder künstlichem Ausgangsmaterial, in der beschriebenen Weise hergestellt werden.

Bezugszeichenliste

1 Ringleitung
5 2 Bioreaktor
3 Membranpumpe
4 Ausgleichskammer
5 Schlauchleitung (für 3)
6 Auslaßventil
10 7 Einlaßventil
8 Aortenklappe (Bioprothese)
9 Hohlzylinder
10 erstes Einsatzstück (in Strömungsrichtung vorn)
11 zweites Einsatzstück (in Strömungsrichtung
15 hinten)
12 Anschlußstutzen
13 Anschlußstutzen
14 Befestigungsabschnitt
15 Befestigungsabschnitt
20 16 Befestigungslöcher
17 Befestigungslöcher
18 Bundsteg von 11
19 erste Dichtung
20 Ringsteg von 9
25 21 Schraubring
22 Bund von 10
23 Schraubklappe
24 Füll- und Ablaßventil
25 Füll- und Ablaßventil
30 26 Membranventil
27 Zweite Dichtung

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von biologischen Prothesen, insbesondere von Implantaten für die Herz- und Gefäßchirurgie, bei dem von einem allogenen oder xenogenen Fremdmaterial durch Entfernen der Zellen eine Kollagen/Elastin-Matrix hergestellt und mit einem Kleber vorbehandelt wird, und anschließend in einem Behälter mit vom jeweiligen Empfänger des Implantats gewonnenen, in einer Zellsuspension befindlichen Zellen besiedelt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die vorbehandelte Kollagen/Elastin-Matrix des Implantats zur Konditionierung der Empfängerzellen in der natürlichen Fließrichtung von einem hinsichtlich Frequenz und Geschwindigkeit an die natürlichen Strömungsverhältnisse im menschlichen Körper angepaßten pulsierenden Zellsuspensionsstrom durchströmt wird, an den sich eine Zell-Erholungs- und Wachstumsphase anschließt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungsgeschwindigkeit des Zellsuspensionsstroms zwischen 0,5 l/min und 5 l/min liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwei oder mehrere Durchströmungsphasen mit gegenüber der vorhergehenden jeweils erhöhter Fließgeschwindigkeit durchgeführt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellkonditionierung ein erster Schritt zur Zellverteilung auf der Kollagen-Matrix durch Drehen des Behälters mit zwischen- und nachgeschalteten Ruhe- und Absetzphasen vorgeschaltet ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellverteilung und -konditionierung und das Zellwachstum bei 37 °C und bei 98 % Luftfeuchte sowie einem CO₂-Gehalt von 5 % durchgeführt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellsuspension etwa 8 Millionen Zellen und einen Serumanteil des Empfängers von 20 % enthält sowie aus Zellwachstumsmitteln, Antibiotika, L-Glutamin und einem Hepes-Puffer besteht.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsprodukt für die Zellbeschichtung eine künstliche Prothese eingesetzt wird.
20. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Ringleitung (1) mit an diese zur Erzeugung eines pulsierenden Flüssigkeitsstromes veränderlicher Geschwindigkeit angeschlossener Membranpumpe (3) und einen in die Ringleitung (1) lösbar eingebundenen Bioreaktor (2), in dem das zu behandelnde allogene oder xenogene Implantatmaterial (8) in Durchströmungsrichtung der Zellsuspension axial angeordnet und unter Vorspannung fixierbar ist.
25. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Bioreaktor (2) aus einem Hohlzylinder (9) mit an dessen gegenüberliegenden Stirnseiten lösbar und abdichtend gehaltenen Einsatzstücken (10, 11) gebildet ist, wobei die Einsatzstücke (10, 11) jeweils einen verschließbaren oder an die Ringleitung (1) anschließbaren Anschußstutzen (12, 13) sowie einen Befestigungsabschnitt (14, 15) zum beidseitigen zent-

rischen Fixieren der Bioprothese (8) im Hohlzylinder (9) aufweisen.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
5 daß die Befestigungsabschnitte (14, 15) kreisringförmig ausgebildet und mit am Umfang verteilten Befestigungslöchern (16, 17) zum Annähen der zu beschichteten Bioprothese (8) versehen sind.
- 10 11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein Einsatzstück (10) von innen und das andere Einsatzstück (11) von außen mit einem Befestigungsmittel (21, 23) an dem Hohlzylinder (9) gehalten ist und beide Einsatzstücke (10, 11) in der gleichen Richtung in den Hohlzylinder (9) einföhrbar bzw. aus diesem entnehmbar sind.
15
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Befestigungsmittel als Schraubring (21), dessen Innengewinde mit einem am Einsatzstück (10) vorgesehenen Außengewinde in Eingriff steht, bzw. als am Umfang des Hohlzylinders (9) verschraubbare Schraubkappe (23) ausgeführt sind.
20
- 25 13. Vorrichtung nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß in die Ringleitung (1) Füll- und Ablaßventile (24, 25) zum Zuführen der Zellsuspension in den Bioreaktor (2) für die Beschichtung der Kollagen-Matrix mit körpereigenen Zellen des Empfängers bzw. zum Abziehen des Mediums aus dem Bioreaktor (2) und der Ringleitung (1) eingebunden sind.
30
- 35 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, gekennzeichnet durch deren Anordnung in einem Inkubator, wobei in dem Bioreaktor (2) und/oder der Ringleitung (1) ein von außen gasdurchlässiges und von

innen für Flüssigkeiten undurchlässiges semipermeabiles Membranventil (26) bzw. eine Membran zum Gasaustausch mit der Atmosphäre im Inkubator vorgesehen ist.

5

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in Strömungsrichtung hinter dem Bioreaktor (2) in die Ringleitung (1) eine Ausgleichskammer (4) zum Ausgleich der Druckspitzen des pulsierenden Flüssigkeitsstroms eingebunden ist.

10

16. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Pumpe (3) eine Membranpumpe ist und ein Auslaß- und ein Einlaßventil (6, 7) aufweist, wobei das Auslaßventil (6) bei der Herstellung von 15 Herzkappenprothesen entfällt.

15

17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mit den körpereigenen Zellen in Berührung kommenden Bauteile aus einem der Zellhaftung entgegenstehenden, biologisch abstoßenden Material bestehen.

20

25

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Einsatzstücke (10, 11) aus Teflon bestehen und der Hohlzylinder (9) aus Piacryl gebildet ist.

30

19. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Ringleitung (1) aus flexilem Material, beispielsweise Silikon, besteht.

1/1

Fig.

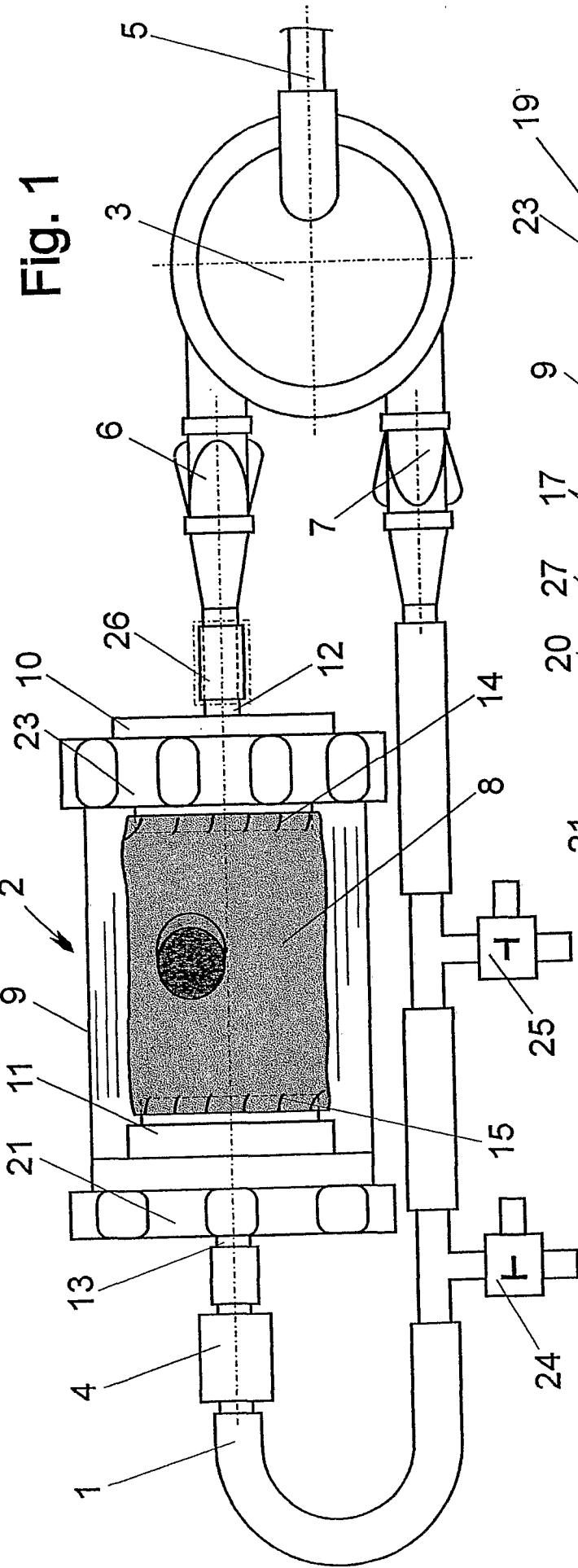


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61L27/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L A61F C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DE 199 15 610 A (BADER AUGUSTINUS) 19 October 2000 (2000-10-19) column 1, line 11,43-46 column 2, line 13-55 column 3, line 1-5,57-62 column 4, line 22-58 column 5, line 23-60 column 6, line 18-61 column 7, line 13-17,36-68 column 9, line 11-27,64-66 column 10, line 55-60</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-19

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2002

Date of mailing of the international search report

08/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Böhm, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional Application No
PCT/DE 01/03632

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 846 828 A (GEE JASON ET AL) 8 December 1998 (1998-12-08) column 1, line 10-16 column 2, line 7-11,15-18,35-45 column 3, line 34-49,66 column 4, line 48-54 column 6, line 5-9,55-67 column 7, line 1-3 claims ---	1-19
A	WO 96 08213 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 21 March 1996 (1996-03-21) page 4, paragraph 3 page 11, paragraphs 4,5 page 38, paragraph 2 ---	1
X	WO 00 37123 A (PAULITSCHKE MANRICO ;SITTINGER MICHAEL (DE); RADEMACHER AXEL (DE);) 29 June 2000 (2000-06-29) page 1, line 5-9 page 2, line 11-37 page 3, line 5-11 page 4 ---	1-3,5-9, 13,15, 17,19
X	EP 0 320 441 A (SULZER AG) 14 June 1989 (1989-06-14) column 1 column 2, line 1-21 column 3, line 40-46 column 4, line 13-28,62-65 column 6, line 36-47 claims 1,7,8,10,11; figure ---	8,9,13, 14,17,19
A	DE 199 38 518 A (VASCULAR BIOTECH GMBH) 26 October 2000 (2000-10-26) column 2, line 9-20,55-68 column 3, line 1-16,39-48 ---	1-19
A	DE 198 28 726 A (BADER AUGUSTINUS DR ;HAVERICH AXEL PROF DR (DE); STEINHOFF GUSTAV) 7 January 1999 (1999-01-07) cited in the application claim 1 ---	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

ational Application No

PCT/DE 01/03632

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
DE 19915610	A 19-10-2000	DE	19915610 A1		19-10-2000
		WO	0059618 A1		12-10-2000
		EP	1083984 A1		21-03-2001
US 5846828	A 08-12-1998	AU	711724 B2		21-10-1999
		AU	5937596 A		30-12-1996
		CA	2224092 A1		19-12-1996
		EP	0847238 A1		17-06-1998
		JP	2001517062 T		02-10-2001
		NZ	309345 A		29-04-1999
		US	6121042 A		19-09-2000
		WO	9639814 A1		19-12-1996
WO 9608213	A 21-03-1996	AU	700911 B2		14-01-1999
		AU	3585595 A		29-03-1996
		AU	9521298 A		04-03-1999
		CA	2199810 A1		21-03-1996
		EP	0781116 A1		02-07-1997
		JP	10511563 T		10-11-1998
		NZ	293419 A		25-11-1998
		WO	9608213 A1		21-03-1996
WO 0037123	A 29-06-2000	WO	0037123 A1		29-06-2000
		DE	19963261 A1		29-06-2000
		EP	1140241 A1		10-10-2001
EP 0320441	A 14-06-1989	CH	675679 A5		31-10-1990
		AT	66581 T		15-09-1991
		DE	3864500 D1		02-10-1991
		EP	0320441 A1		14-06-1989
		JP	2140159 A		29-05-1990
		JP	2657081 B2		24-09-1997
DE 19938518	A 26-10-2000	DE	19938518 A1		26-10-2000
		AU	4295800 A		10-11-2000
		WO	0064569 A1		02-11-2000
		EP	1173272 A1		23-01-2002
DE 19828726	A 07-01-1999	DE	19828726 A1		07-01-1999
		WO	9900152 A2		07-01-1999
		EP	0989867 A2		05-04-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03632

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61L27/38

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61L A61F C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 15 610 A (BADER AUGUSTINUS) 19. Oktober 2000 (2000-10-19) Spalte 1, Zeile 11,43-46 Spalte 2, Zeile 13-55 Spalte 3, Zeile 1-5,57-62 Spalte 4, Zeile 22-58 Spalte 5, Zeile 23-60 Spalte 6, Zeile 18-61 Spalte 7, Zeile 13-17,36-68 Spalte 9, Zeile 11-27,64-66 Spalte 10, Zeile 55-60 ---	1-19 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patenfamilie

- ^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- ^{'A*} Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- ^{'E*} älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- ^{'L*} Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- ^{'O*} Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- ^{'P*} Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- ^{'T*} Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- ^{'X*} Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- ^{'Y*} Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- ^{'&*} Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patenfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28. Februar 2002

08/03/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Böhm, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03632

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 846 828 A (GEE JASON ET AL) 8. Dezember 1998 (1998-12-08) Spalte 1, Zeile 10-16 Spalte 2, Zeile 7-11,15-18,35-45 Spalte 3, Zeile 34-49,66 Spalte 4, Zeile 48-54 Spalte 6, Zeile 5-9,55-67 Spalte 7, Zeile 1-3 Ansprüche ---	1-19
A	WO 96 08213 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 21. März 1996 (1996-03-21) Seite 4, Absatz 3 Seite 11, Absätze 4,5 Seite 38, Absatz 2 ---	1
X	WO 00 37123 A (PAULITSCHKE MANRICO ;SITTINGER MICHAEL (DE); RADEMACHER AXEL (DE);) 29. Juni 2000 (2000-06-29) Seite 1, Zeile 5-9 Seite 2, Zeile 11-37 Seite 3, Zeile 5-11 Seite 4 ---	1-3,5-9, 13,15, 17,19
X	EP 0 320 441 A (SULZER AG) 14. Juni 1989 (1989-06-14) Spalte 1 Spalte 2, Zeile 1-21 Spalte 3, Zeile 40-46 Spalte 4, Zeile 13-28,62-65 Spalte 6, Zeile 36-47 Ansprüche 1,7,8,10,11; Abbildung ---	8,9,13, 14,17,19
A	DE 199 38 518 A (VASCULAR BIOTECH GMBH) 26. Oktober 2000 (2000-10-26) Spalte 2, Zeile 9-20,55-68 Spalte 3, Zeile 1-16,39-48 ---	1-19
A	DE 198 28 726 A (BADER AUGUSTINUS DR ;HAVERICH AXEL PROF DR (DE); STEINHOFF GUSTAV) 7. Januar 1999 (1999-01-07) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 1 ---	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03632

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19915610	A	19-10-2000	DE	19915610 A1	19-10-2000
			WO	0059618 A1	12-10-2000
			EP	1083984 A1	21-03-2001
US 5846828	A	08-12-1998	AU	711724 B2	21-10-1999
			AU	5937596 A	30-12-1996
			CA	2224092 A1	19-12-1996
			EP	0847238 A1	17-06-1998
			JP	2001517062 T	02-10-2001
			NZ	309345 A	29-04-1999
			US	6121042 A	19-09-2000
			WO	9639814 A1	19-12-1996
WO 9608213	A	21-03-1996	AU	700911 B2	14-01-1999
			AU	3585595 A	29-03-1996
			AU	9521298 A	04-03-1999
			CA	2199810 A1	21-03-1996
			EP	0781116 A1	02-07-1997
			JP	10511563 T	10-11-1998
			NZ	293419 A	25-11-1998
			WO	9608213 A1	21-03-1996
WO 0037123	A	29-06-2000	WO	0037123 A1	29-06-2000
			DE	19963261 A1	29-06-2000
			EP	1140241 A1	10-10-2001
EP 0320441	A	14-06-1989	CH	675679 A5	31-10-1990
			AT	66581 T	15-09-1991
			DE	3864500 D1	02-10-1991
			EP	0320441 A1	14-06-1989
			JP	2140159 A	29-05-1990
			JP	2657081 B2	24-09-1997
DE 19938518	A	26-10-2000	DE	19938518 A1	26-10-2000
			AU	4295800 A	10-11-2000
			WO	0064569 A1	02-11-2000
			EP	1173272 A1	23-01-2002
DE 19828726	A	07-01-1999	DE	19828726 A1	07-01-1999
			WO	9900152 A2	07-01-1999
			EP	0989867 A2	05-04-2000